

12

# DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

21 Numéro de dépôt: 79400853.2

51 Int. Cl.<sup>3</sup>: C 12 N 15/00  
 //C12N9/88

22 Date de dépôt: 13.11.79

30 Priorité: 14.11.78 FR 7832100

43 Date de publication de la demande:  
 28.05.80 Bulletin 80/11

84 Etats Contractants Désignés:  
 BE CH DE GB IT NL

71 Demandeur: AGENCE NATIONALE DE VALORISATION  
 DE LA RECHERCHE (ANVAR)  
 13, rue Madeleine Michelis  
 F-92522 Neuilly-sur-Seine(FR)

72 Inventeur: Aigle, Michel  
 151, Route Burkel  
 67400 Illkirch-Graffenstaden(FR)

72 Inventeur: Blanc, Hughes  
 71, Av. du Général Leclerc Résidence Aquitaine II  
 F-92100 Boulogne Billancourt(FR)

72 Inventeur: Fournier, Philippe  
 19 bis, Bld de la République  
 F-78000 Versailles(FR)

72 Inventeur: Gerbaud, Claude  
 3, Allée Dunant  
 93220 Gagny(FR)

72 Inventeur: Guérineau, Michel  
 45, rue St-Placide  
 F-75006 Paris(FR)

72 Inventeur: Heslot, Henri, Prof.  
 29, rue Rousselet  
 Paris 7(FR)

72 Inventeur: Lacroute, François, Prof.  
 20, rue de Copenhague  
 67000 Strasbourg(FR)

74 Mandataire: Martin, Jean-Jacques et al,  
 Cabinet REGIMBEAU 26, Avenue Kléber  
 F-75116 Paris(FR)

54 Nouveaux plasmides hybrides et microorganismes les contenant.

57 La présente invention concerne les plasmides hybrides.  
 Il s'agit d'un plasmide hybride comportant au moins  
 l'ADN du plasmide 2 $\mu$  de levure et un segment d'ADN renfer-  
 mant le gène URA<sup>r</sup> de levure.

Ces plasmides sont utiles comme vecteurs d'ADN exo-  
 gène dans les levures.

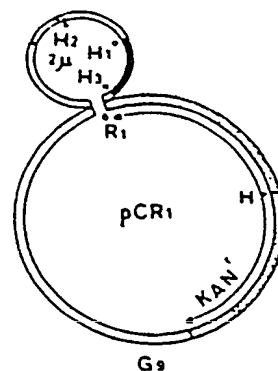


FIG. 2

EP 0 011 562 A1

NOUVEAUX PLASMIDES HYBRIDES ET MICROORGANISMES LES  
CONTENANT

La présente invention concerne un nouveau type de plasmide hybride utile pour modifier les propriétés des souches de microorganismes et notamment de levures ainsi que les microorganismes comportant ces plasmides hybrides.

Récemment des procédés mettant en oeuvre des plasmides bactériens ont permis d'obtenir des souches de bactéries produisant des peptides et des protéines très intéressants sur le plan industriel comme la somatostatine, l'insuline et l'ovalbumine.

Toutefois, ces systèmes bactériens, compte tenu des différences qui existent dans les systèmes de transcription et de traduction eucaryotes et procaryotes, sont soumis à de sérieuses limitations. En outre, un certain nombre de gènes eucaryotes sont discontinus et présentent des insertions (jusqu'à 7 pour l'ovalbumine de poule). Cette situation explique que de tels gènes ne peuvent être correctement traduits par un procaryote, à moins évidemment de construire un gène sans insertion.

Il est donc clair que, dans ce domaine, les levures qui sont des microorganismes eucaryotes offrent la possibilité de s'affranchir de ces contraintes et présentent donc un grand intérêt potentiel pour de multiples applications pratiques.

Toutefois, jusqu'à une date récente, on ignorait comment faire rentrer un acide désoxyribonucléique

(ADN) exogène dans une levure et obtenir qu'il s'y maintienne sous forme stable et s'y exprime.

5 Cet obstacle a récemment été levé par les travaux de A. Hinnen, J.B. Hicks et G.R. Finck en utilisant un plasmide bactérien portant le gène  $LEU_2^+$  de la levure (vecteur). Les clones de levures obtenus par traitement à l'aide de ce plasmide se sont avérés avoir intégré tout ou partie du vecteur sans toutefois que celui-ci se maintienne à l'état libre dans le cytoplasme.

10 Ce procédé présente toutefois le désavantage de ne pas permettre l'amplification de l'ADN d'origine exogène. On sait, en effet, que certains plasmides bactériens existent à l'état de copie multiple dans les  
15 bactéries qui les portent et, par ailleurs, on sait qu'il existe dans certaines souches de levures, en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, un plasmide désigné par le sigle  $2\mu$  en raison de sa longueur. Ce plasmide  $2\mu$  existe au nombre de 50 à 100 exemplaires par cellule  
20 et si on ne lui connaît pas, jusqu'à présent, de fonction génétique précise, on sait qu'il est transcrit au moins en partie et qu'il peut ainsi constituer un vecteur potentiel d'un grand intérêt.

25 La présente invention a pour but de fournir des vecteurs plasmidiques permettant d'introduire à volonté un gène particulier dans un microorganisme et plus particulièrement dans une levure.

30 Un autre but de l'invention est que le gène particulier ainsi introduit soit stable, puisse s'exprimer et soit amplifié.

35 Grâce à cette invention, on dispose ainsi d'un moyen permettant de modifier les propriétés d'un microorganisme et surtout d'une levure de façon prédéterminée et ce dans des proportions très supérieures aux techniques de mutations connues.

La présente invention concerne un plasmide hybride composé d'au moins un ADN d'un plasmide bactérien, tout ou partie de l'ADN du plasmide  $2\mu$  de levure et d'un segment d'ADN renfermant le gène  $URA_3^+$  de levure.

Il peut être utile de rappeler que le plasmide  $2\mu$  de levure est connu et une étude très complète peut en être trouvée dans "Viruses and Plasmids in Fungi" éditeur Paul A. Lemke, cet ouvrage pourra également être utilisé comme référence pour la définition de certains termes dont la définition complète ne serait pas donnée dans la présente description.

Le gène  $URA_3^+$  est le gène codant pour l'orotidine-5'-phosphate-décarboxylase, en son absence la levure ne peut se développer que sur un milieu contenant de l'uracil. La présence ou l'absence de ce gène permet de "cribler" les levures en utilisant un milieu avec et sans uracil.

Dans un mode de réalisation préféré du plasmide selon la présente invention, le segment d'ADN renfermant le gène  $URA_3^+$  de levure est inséré dans l'ADN du plasmide  $2\mu$  de levure, en particulier le segment d'ADN renfermant le gène  $URA_3^+$  de levure est inséré dans l'ADN du plasmide  $2\mu$  de levure entre les sites de restriction Hind III (2) et Hind III (3) avec perte du segment correspondant de l'ADN du plasmide  $2\mu$  de levure.

Les sites de restriction Hind III correspondent aux endroits de la molécule ADN qui sont coupés par une enzyme particulière, l'endonucléase Hind III (qui sera appelée ci-après par abréviation Hind III). Ces sites de restriction Hind III sont au nombre de 3 sur le plasmide  $2\mu$  et sont appelés Hind III (1), Hind III (2) et Hind III (3) (qui seront appelés ci-après par abréviation H1, H2 et H3).

Dans un autre mode de réalisation des plasmides selon la présente invention, le segment d'ADN renfermant le gène  $URA_3^+$  de levure est inséré dans l'ADN du plasmide bactérien.

5            Parmi les ADN de plasmide bactérien utilisables il faut citer plus particulièrement l'ADN du plasmide pCRL et du plasmide pBR 322 (Bethesda Research Laboratory Inc., in Rockville, Maryland).

10           Dans un mode de réalisation particulièrement intéressant de la présente invention, en particulier lorsque le segment d'ADN renfermant le gène  $URA_3^+$  est inséré dans l'ADN du plasmide  $2\mu$ , l'ADN du plasmide bactérien comporte l'insertion d'un ADN exogène provenant d'un organisme procaryote ou surtout d'un organisme eucaryote tel qu'une levure.

15           On peut également prévoir dans le cadre de la présente invention des plasmides hybrides dans lesquels le plasmide  $2\mu$  comporte une insertion d'un ADN exogène provenant d'un organisme procaryote ou surtout eucaryote.

20           Les plasmides vecteurs selon la présente invention peuvent être préparés par des techniques connues.

25           On donnera, ci-après, une technique générale permettant de préparer deux plasmides selon la présente invention particulièrement intéressants.

Afin de faciliter la compréhension du procédé, certains des plasmides mis en oeuvre dans cette technique sont représentés sur les figures annexées où :

30           - la figure 1 représente le schéma de l'ADN du plasmide PTY 39,

- la figure 2 représente le schéma de l'ADN du plasmide G 9,

35           - la figure 3 représente le schéma de l'ADN du plasmide G 18.

- la figure 4 représente le schéma de l'ADN du plasmide pFL 1,

- la figure 5 représente le schéma de l'ADN du plasmide pMA 1,

5 On part d'un plasmide hybride PTY 39 décrit dans l'article de Hollenberg et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 2072-2076, (1976). Ce plasmide est représenté à la figure 1.

10 Le plasmide PTY 39 est constitué de deux séquences :

- l'ADN du plasmide 2 $\mu$  de levure et  
- l'ADN bactérien de pCR1 sur lequel on a indiqué en pointillé et par les lettres KAN<sup>r</sup> le gène du plasmide qui lui permet de conférer le caractère de  
15 résistance à la kanamycine.

Le fragment d'ADN correspondant au plasmide pCR1 ne possède qu'un site de restriction Hind III désigné par H et situé dans le gène KAN<sup>r</sup>.

20 l'ADN du plasmide 2 $\mu$  de PTY 39 comporte pour sa part trois sites de restriction Hind III qui sont numérotés H1, H2 et H3 et un site de restriction Eco RI, noté R1, entre H1 et H3 en plus des sites de restriction Eco RI de jonction, comme précédemment, la présence de ces sites de restriction Eco RI signifie que l'ADN est  
25 coupé à ce niveau par l'endonuclease Eco RI.

Il est important de noter que le site de restriction Eco RI est situé entre les sites de restriction Hind III (1) et Hind III (3).

30 Les éléments hachurés de l'ADN du plasmide 1 situent les séquences répétées inverses.

Ce plasmide hybride PTY 39 est accumulé en un très grand nombre de copies en traitant la bactérie qui en est porteuse par le chloramphénicol.

35 D'un autre côté, on utilise un plasmide hybride PMB 9 - URA<sub>3</sub><sup>+</sup> constitué d'un plasmide bactérien

pMB 9 dans lequel on a inséré un fragment d'ADN de levure portant le gène  $URA_3^+$  encadré par deux sites de restriction Hind III.

5 On effectue tout d'abord une digestion modérée du plasmide PTY 39 par l'endonucléase Hind III.

Puis une digestion complète du plasmide pMB 9 -  $URA_3^+$  par la même enzyme suivie d'une séparation des fragments de restriction par électrophorèse et on isole un fragment de 1,1 kilobase portant le gène  $URA_3^+$ .

10

On mélange alors le plasmide PTY 39 partiellement digéré avec le fragment portant le gène  $URA_3^+$  isolé précédemment en présence de ligase.

Puis on transforme des bactéries *pyrF* (c'est-à-dire affectées dans le gène de l'orotidine-5'-phosphate-décarboxylase) par l'ADN obtenu après ligation à l'étape précédente.

15

On sélectionne ensuite les clones se développant sur milieu minimum qui sont les *Escherichia coli*  $pyr^+$  qui ont donc intégré les plasmides portant le gène  $URA_3^+$ .

20

Parmi ces *Escherichia coli*  $pyr^+$  on sépare les clones sensibles à la kanamycine, on obtient ainsi deux types de souches :

25 *Escherichia coli*  $pyr^+ Kan^R$  et  
*Escherichia coli*  $pyr^+ Kan^S$ .

On extrait alors de ces deux types de souches deux types de plasmides selon l'invention :

30 - le plasmide G 9 qui confère le phénotype  $pyr^+ Kan^R$  et  
- le plasmide G 18 qui confère le phénotype  $pyr^+ Kan^S$ .

Les plasmides G 9 et G 18 sont représentés respectivement sur les figures 2 et 3.

35 Le plasmide G 9 comporte une partie d'ADN

bactérien provenant de pCR 1 identique à celle que l'on trouvait dans PTY 39. Quant à la partie ADN de levure, on a représenté en trait noir épais le segment d'ADN porteur de gène  $URA_3^+$  et qui s'est fixé entre les sites de restriction H1 et H3 avec une perte du segment de plasmide  $2\mu$  correspondant.

Il est important de noter que le remplacement du segment d'ADN du plasmide  $2\mu$  situé entre les sites de restriction Hind III (A) et Hind III (3) par l'ADN de levure portant le gène  $URA_3^+$  a pour effet de faire disparaître le site de restriction Eco RI se trouvant à l'origine dans l'ADN du plasmide  $2\mu$  entre les sites H1 et H3.

G 18 comporte intégralement l'ADN du plasmide  $2\mu$  comme pour PTY 39, par contre le fragment d'ADN bactérien provenant de pCR1 comporte l'insertion, au niveau du site de restriction Hind III, du fragment d'ADN portant le gène  $URA_3^+$  représenté en trait noir.

Les plasmides hybrides G 9 et G 18 ainsi obtenus peuvent être conservés tel quel ou dans une levure ou une bactérie où ils se multiplieront et pourront en être extraits à la demande.

Ces plasmides peuvent être intégrés dans une levure par le procédé suivant.

On utilise une souche de levure de *Saccharomyces cerevisiae*  $URA_3^-$ , dans le cas présent et afin de mieux étudier le phénomène on utilise une levure à faible taux de reversion.

Cette souche cultivée sur milieu complet est récoltée en phase exponentielle.

Les cellules sont alors transformées en protoplastes par digestion des parois à l'aide d'hélicase en présence d'un stabilisateur osmotique.

Les protoplastes sont mis en présence de l'ADN du plasmide hybride G 9 ou G 18 pendant environ



10 minutes puis on mélange avec du polyéthylène glycol à 30% et on laisse agir pendant environ 15 minutes. On centrifuge et le culot est remis en suspension dans un milieu complet contenant un stabilisant osmotique. On  
5 incube pendant 1 heure à 30°C puis on procède à une deuxième centrifugation. Le culot est alors resuspendu dans un milieu hypertonique contenant de l'agar (3%) maintenu en surfusion à 44°C et 0,03% d'extrait de levure.

10 L'ensemble est coulé dans des boîtes de Pétri.

Aux fins de comparaison, on traite de la même façon des levures témoins mais sans ajouter d'ADN de plasmide hybride.

15 Au bout de 3 à 5 jours, il apparaît de nombreuses colonies sur les boîtes correspondant aux cellules traitées par l'ADN alors qu'il n'y en a pas sur les boîtes témoins.

20 Les colonies ainsi obtenues sont appelées "transformants" et constituent des microorganismes entrant dans le cadre de l'invention à la fois comme source de plasmide hybride G 9 ou G 18 et comme moyen notamment pour la préparation de l'orotidine-5'-phosphate-décarboxylase.

25 En effet, on a mesuré l'activité spécifique de l'orotidine-5'-phosphate-décarboxylase dans la souche sauvage  $URA_3^+$  et dans un certain nombre de transformants, c'est-à-dire de souches selon la présente invention et on a constaté que si dans la souche sauvage  
30 l'activité de l'enzyme est de deux unités, cette activité varie entre 10 et 35 chez les transformants, ce qui représente un facteur multiplicatif de 5 à 18.

35 Cette description permet de comprendre les fonctions des différentes parties des plasmides selon la présente invention :

- le fragment  $URA_3^+$  permet de "cribler" les microorganismes traités par les plasmides de l'invention

- le fragment  $2\mu$  permet d'amplifier les propriétés transférées par les plasmides de l'invention.

5 Les souches selon la présente invention peuvent donc être envisagées comme moyen de production de l'orotidine-5'-phosphate-décarboxylase qui est un produit utilisé dans les industries enzymatiques.

10 Un autre intérêt des plasmides hybrides selon la présente invention, notamment des plasmides hybrides G 9 et G 18, est qu'ils peuvent, dans le cadre de l'invention, être modifiés afin de servir de vecteurs pour l'introduction d'ADN exogène dans des microorganismes qui, après transformation, font également partie de la  
15 présente invention.

Il faut remarquer, à ce propos, que dans le cas du plasmide hybride G 9 ce dernier ne présente de sites de restriction Eco RI qu'à la jonction entre l'ADN de levure et l'ADN bactérien et qu'en conséquence  
20 l'action de l'endonucléase Eco RI conduit à la séparation de l'ADN levure et de l'ADN bactérien et qu'ainsi on peut aisément fixer sur le site Eco RI de l'ADN levure un nouvel ADN bactérien portant par exemple un ADN exogène.

25 Pour ce qui concerne le plasmide hybride G 18, celui-ci présente l'avantage de posséder un ADN de plasmide  $2\mu$  complet ce qui permet d'envisager sa répliquation et son maintien dans une souche de levure par exemple de façon beaucoup plus sûre que dans le cas du plasmide G 9 dont l'ADN du plasmide  $2\mu$  a été amputé d'un  
30 segment entre les sites de restriction Hind III (1) et Hind III (3). Toutefois, cet avantage doit être pondéré compte tenu du fait que G 18 possède deux sites de restrictions Eco RI qui lors de l'action de l'enzyme  
35 correspondante peuvent conduire à un fractionnement plus

complexe de l'ADN que dans le cas de G 9 et rendre ainsi plus difficile l'introduction d'ADN bactérien portant un ADN exogène.

5 Les exemples suivants sont destinés à illustrer un procédé de préparation de plasmides hybrides et de microorganismes selon la présente invention sans pour autant qu'ils puissent être considérés comme limitant la portée de ladite invention.

EXEMPLE 1

10 Préparation des plasmides G 9 et G 18  
On prépare un plasmide  $\text{PMB9} - \text{URA}_3^+$  par les procédés connus (T.D. Petes et al., Gene, vol. IV, 1978, p. 37-49) par exemple en faisant digérer l'ADN d'une levure sauvage de *Saccharomyces cerevisiae* par l'endonucléase Hind III, et en faisant de même digérer le plasmide  $\text{PMB 9}$  (Bolivar et al. Gene 2, 75-93 (1977) par la même enzyme. Les deux produits de digestion sont ligaturés par la ligase ADN T 4. On effectue ensuite le tri des plasmides obtenus en utilisant une souche de *Escherichia coli*  $\text{URA}_3^-$  que l'on transforme par lesdits plasmides qui sont les seuls à croître sur un milieu minimum (sans uracil). On extrait alors les plasmides  $\text{PMB 9} - \text{URA}_3^+$  des souches *Escherichia coli*  $\text{URA}_3^+$  sélectionnées.

20 20  $\mu\text{g}$  du produit de digestion du plasmide  $\text{PMB 9} - \text{URA}_3^+$  par l'endonucléase Hind III (fourni par la firme Boehringer) sont soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%.

30 Le fragment de 1,1 kilobase portant le gène  $\text{URA}_3^+$  de la levure est récupéré à partir du gel par la méthode dite "Freeze et Squeeze" (Thuring, 1975) et par précipitation à l'éthanol.

35 l'ADN circulaire du plasmide PTY 39 est partiellement digéré par l'endonucléase Hind III pour obtenir un maximum de molécule ne comportant qu'une

seule coupure. Après chauffage à 60°C pendant 10 minutes pour inactiver l'enzyme et après dialyse, 1 µg de l'ADN digéré de PTY 39 est mélangé avec environ 0,05 µg du fragment de 1,1 kilobase portant le gène  $URA_3^+$  de la levure. Les deux morceaux sont liés par de la ligase ADN T 4 dans un volume de 50 µl pendant 3 minutes à 37°C puis pendant 5 heures à 10°C.

Le mélange de ligation (50 µl) est dilué par 900 µl d'un tampon contenant 10 mM de Tris pH 7, 10 mM de  $CaCl_2$ , 10 mM de  $MgSO_4$ . 100 µl de ce mélange dilué sont ajoutés à 200 µl de cellules d'*Escherichia coli*  $URA_3^-$  préparé pour transformation par le procédé de Cohen et al (1975). Le mélange de transformation est abandonné sur la glace pendant 25 minutes puis soumis pendant 3 minutes à un chauffage pulsé à 37°C puis abandonné à la température ambiante pendant 10 minutes. 1 ml de milieu complet est alors ajouté et le mélange est agité à 37°C pendant 1 heure. Les cellules sont alors rassemblées par centrifugation puis étalées sur un milieu minimum, c'est-à-dire un milieu M 63, contenant du tryptophane. Les clones  $URA_3^+$  obtenus sont alors sélectionnés en tenant compte de leur résistance à la kanamycine.

On sélectionne ainsi les clones d'*Escherichia coli* porteurs de G 9 qui résistent à la kanamycine et les clones d'*Escherichia coli* porteurs de G 18 qui ne résistent pas à la kanamycine.

Ces plasmides sont alors extraits.

## EXEMPLE 2

### Préparation de levures

On prépare les souches de levures réceptrices  $URA_3^-$  en les cultivant sur 500 ml de milieu complet jusqu'à une densité cellulaire d'environ  $2 \cdot 10^7$  cellules/ml. Les cellules sont alors lavées dans 300 ml d'eau distillée et dans le même volume de sorbitol 1,2 M.

Elles sont remises en suspension dans 50 ml d'un mélange de sorbitol 1,2 M, 0,05 M phosphate-citrate pH 5,8 et d'hélicase (fourni par l'Industrie Biologique Française) qui est ajouté jusqu'à une concentration  
5 finale de 6 500 unités par ml. Les cellules sont incubées à 28°C pendant 1 heure à 1 heure 30 sous légère agitation. Durant l'incubation la formation des sphéroplastes est suivie par une méthode optique.

Les sphéroplastes sont lavés par centrifugation à température ambiante et remis en suspension trois  
10 fois dans 150 ml de sorbitol 1,2 M puis une fois dans une solution de sorbitol 1,2 M, 10 mM de Tris pH 7,6 et 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Les sphéroplastes sont concentrés dans le même tampon jusqu'à une densité cellulaire d'environ  
15  $10^9$  cellules/ml. L'ADN de plasmide obtenu précédemment dans  $\text{CaCl}_2$  10 mM et Tris pH 6 10 mM (environ 10  $\mu\text{l}$ ) est mélangé avec 0,2 ml de sphéroplastes jusqu'à une concentration de 5 à 15  $\mu\text{g}$  par ml. Le mélange est abandonné à la température ambiante pendant 10 minutes puis on  
20 ajoute 2 ml de Tris 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM dans du polyéthylène 4 000 à 30%. Après mélange, l'ensemble est abandonné 15 minutes à la température ambiante. Les sphéroplastes sont récupérés par centrifugation à 2 500 g pendant 10 minutes puis remis en suspension dans un milieu  
25 contenant 1,2 M sorbitol, 4 g/l d'extrait de levure, 6 g/l de glucose, 6 g/l de bactopeptone Difco, 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  et 10 mM de Tris pH 6 puis agité légèrement pendant 1 heure à 28°C.

L'ensemble est centrifugé puis remis en  
30 suspension dans 0,2 ml du tampon précédent. Les échantillons sont mélangés avec 8 ml de gélose (1,2 M sorbitol, 20 g/l de glucose, 0,8 g/l de bactotryptone Difco, 0,3 g/l d'extrait de levure, 30 g/l de gélose purifiée Difco) à 44°C et versé dans le même milieu à l'exception  
35 de la concentration en gélose qui est de 20 g/l.

Les dilutions sont étalées par le même procédé dans les mêmes milieux supplémentés avec 50 µg/l d'uracil de façon à mesurer l'efficacité de la régénération des sphéroplastes.

5 Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau I.

EXEMPLE 3

On opère comme dans l'exemple 2 et on obtient les résultats rassemblés dans le tableau I.

10

TABLEAU I

<u>ADN</u>	<u>Ex</u>	<u>NOMBRE DE CELLULES</u> <u>PAR BOITE</u>	<u>NOMBRE DE CELLULES</u> <u>REGENEREES</u>	<u>POURCENTAGE DE</u> <u>REGENERATION</u>	<u>NOMBRE DE CLONES</u> <u>URA+</u>	<u>FREQUENCE DE</u> <u>TRANSFORMATION</u> <u>PAR CELLULE VIABLE</u>
G 18	2	$2,4 \times 10^8$	$6,4 \times 10^7$	26,7	1 000	$1,5 \times 10^{-5}$
	3	$5,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	3,2	18	$1,0 \times 10^{-4}$
G 9	2	$2,4 \times 10^8$	$6,4 \times 10^7$	26,7	1 500	$2,3 \times 10^{-5}$
	3	$5,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	3,2	30	$1,8 \times 10^{-4}$
Aucun	2	$2,4 \times 10^8$	$6,4 \times 10^7$	26,7	0	
	3	$5,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	3,2	0	

EXEMPLE 4Etude de l'activité des levures obtenues

On dose l'activité d'orotidine-5'-phosphate-décarboxylase par prélèvement des cellules en phase de croissance logarithmique sur milieu minimum et un extrait brut est préparé par le procédé de Lacroute (1962).

L'essai enzymatique est conduit selon Beckwith et al. (1962) excepté le fait que  $MgCl_2$  est mis dans le mélange réactionnel. Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry et al. (1951) la lysozyme étant utilisée comme étalon.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau II.

Les souches TRA (transformants) sont des souches obtenues dans les exemples 2 et 3.

L'activité spécifique pour l'orotidine-5'-phosphate-décarboxylase est exprimée en nmoles de substrat décarboxylé par minute et par milligramme de protéine.

L'augmentation de l'activité spécifique indique le rapport entre l'activité spécifique des TRA après correction à l'activité spécifique de la souche sauvage.

25



TABEAU II

<u>PLASMIDES</u>	<u>SOUCHES</u>	<u>ACTIVITE SPECIFIQUE</u>	<u>POURCENTAGE DE PHOTOTROPHES DANS LA CULTURE</u>	<u>ACTIVITE SPECIFIQUE CORREE</u>	<u>AUGMENTATION D'ACTIVITE SPECIFIQUE</u>
Aucun	Souche sauvage	2	100	2	1
G 9	TRA <sub>1</sub>	35	46	76	38
	TRA <sub>2</sub>	21	52	40	20
	TRA <sub>3</sub>	33	44	75	38
G 18	TRA 363	15	67	22	11
	TRA 366	10	43	23	12
	TRA 367	22	81	27	14

EXEMPLE 5

- De façon analogue aux exemples 1 et 2,
- on prépare un plasmide pBR 322 avec le fragment portant le gène  $URA_3^+$  inséré au niveau du site Hind III ;
  - on effectue la digestion partielle du plasmide obtenu par l'enzyme Eco RI ;
  - on effectue la digestion partielle du plasmide 2  $\mu$  de la souche de *S. cerevisiae* FL 100 ATCC 28383 par l'enzyme Eco RI ;
  - on mélange les deux produits de digestion après inhibition de l'enzyme Eco RI et on ligature les fragments du mélange avec la ligase une nuit à 10°C.
  - on extrait les plasmides obtenus et on transforme une souche de levure *S. cerevisiae* réceptrice  $ura_3$ , c'est-à-dire ne pouvant croître sans uracile, et on sélectionne les transformats capables de croître sur milieu sans uracile. De ces transformats  $URA_3^+$  on extrait les plasmides qui peuvent, comme cela a été décrit, être utilisés pour transformer une souche *E. coli*  $URA_3^-$ , laquelle par sélection des souches  $URA_3^+$  obtenues constitue un réservoir de plasmide dont la structure est donnée dans les figures 4 et 5 ci-annexées.

La figure 4 représente le plasmide pFL 1 (représenté en traits pointillés) qui comporte l'ADN du plasmide pBR 322 avec insertion de l'ADN du gène  $URA_3^+$  (représenté en double trait) au niveau du site Hind III de l'ADN de pBR 322 et insertion au niveau du site Eco RI de pBR 322 d'un fragment de l'ADN du plasmide 2  $\mu$ , le fragment 2  $\mu$ D (fragment défini par rapport aux sites Eco RI).

Il a été isolé 3 autres plasmides, pFL 2, pFL 3 et pFL 4. Pour pFL 2 l'ADN du gène  $URA_3^+$  a l'orientation inverse, c'est-à-dire que le site Pst I se trouve à 0,8 kb du site Eco RI pris comme origine.

Les plasmides pFL 3 et pFL 4 ont le fragment 2  $\mu$ D dans l'orientation inverse de celle observée respectivement pour pFL 1 et pFL 2. La longueur totale de ce plasmide est de 7,652 kb.

5                   Le plasmide pBR 322 porte un gène de résistance à l'ampicilline ( $Amp^r$ ), gène qui code pour une pénicillinase. Dans une levure transformée par un plasmide de ce type (comme pFL 1 ou pFL 2) ce gène  
10 bactérien est exprimé et on identifie une excrétion de pénicillinase par les levures transformées, ce qui montre l'intérêt des plasmides décrits dans la présente invention pour l'excrétion de protéines (enzymes en particulier).

15                   Un autre avantage de ces plasmides est qu'ils démontrent que l'intégralité du plasmide 2  $\mu$  n'est pas indispensable à sa répllication et à son maintien dans la levure. L'avantage de cette construction est qu'elle permet d'envisager de cloner des fragments d'ADN étrangers de grande taille puisque le plasmide récepteur est  
20 plus petit. En effet, des plasmides de trop grand taille sont plus fragiles, plus difficiles à manipuler et à extraire des bactéries ou des levures.

De façon identique, on obtient le plasmide pMA 1 représenté à la figure 5.

25                   Ce plasmide a la même structure que les précédents mais présente l'intégralité de l'ADN du plasmide 2  $\mu$  (2  $\mu$ A + 2  $\mu$ D) au lieu du fragment 2  $\mu$ D.

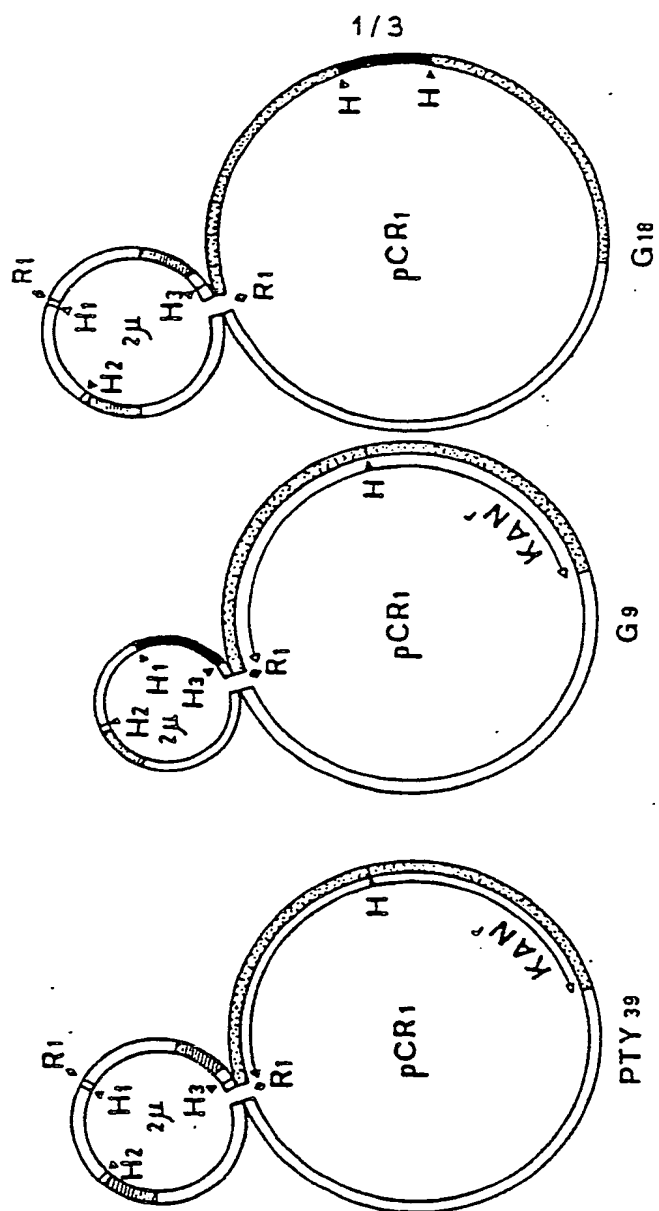
30                   Un plasmide analogue à ceux décrits ci-dessus a été utilisé, voir Panthier J.J. et col., Comptes Rendus Acad. Sciences, Série D, 1979, Séance du 29 octobre, en y insérant l'ADN du gène lacZ d'E. coli pour transformer une souche de S. cerevisiae. On observe dans la levure transformée la présence d'une galactosidase qui est  
35 absente de la souche de départ, ceci permet de conclure que le gène bactérien lacZ est exprimé chez la levure.

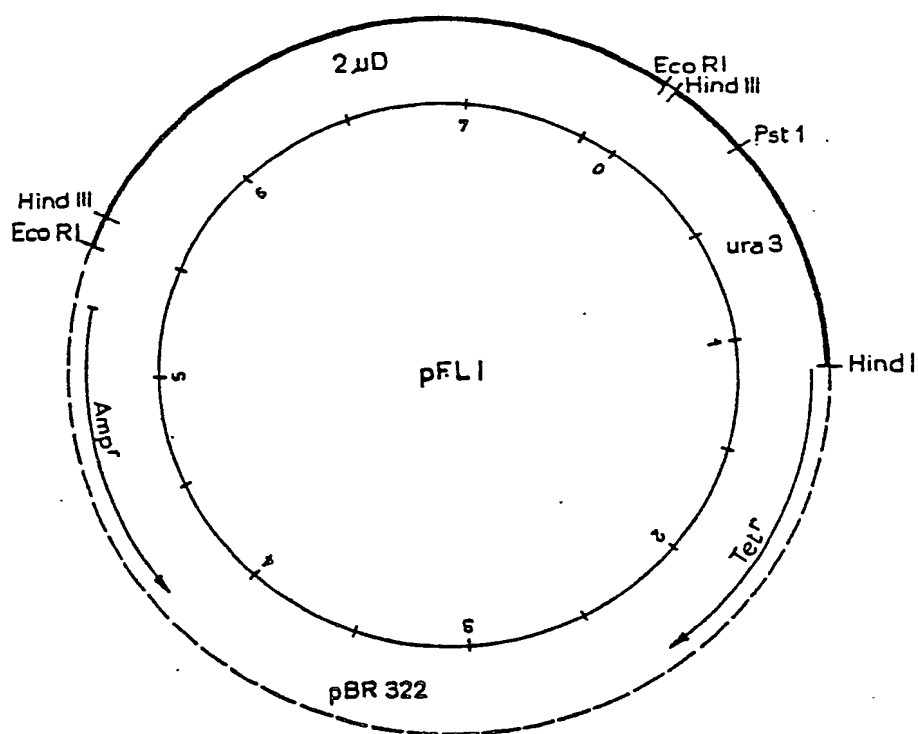
REVENDICATIONS

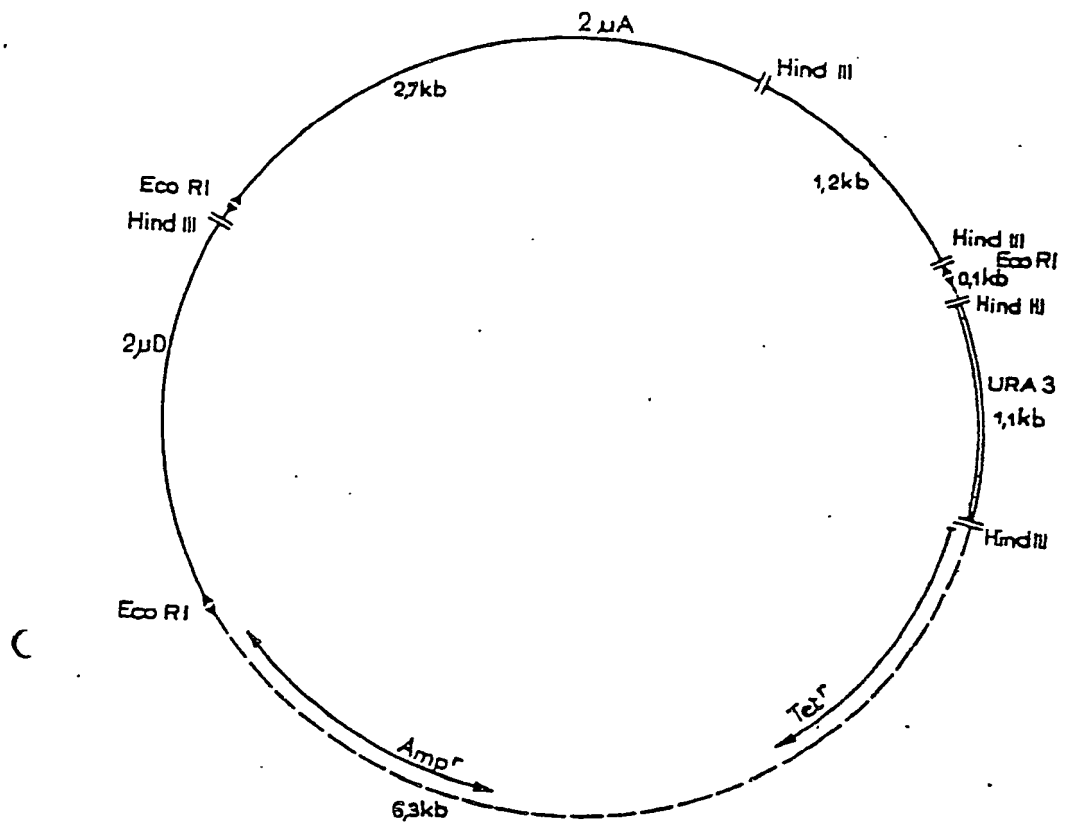
1. Un plasmide hybride comportant au moins l'ADN d'un plasmide bactérien, tout ou partie de l'ADN du plasmide 2  $\mu$  de levure et un segment d'ADN renfermant le gène  $URA_3^+$  de levure.
2. Un plasmide hybride selon la revendication 1, caractérisé en ce que le segment d'ADN renfermant le gène  $URA_3^+$  de levure est inséré dans l'ADN du plasmide 2 $\mu$  de levure.
3. Un plasmide hybride selon la revendication 2, caractérisé en ce que le segment d'ADN renfermant le gène  $URA_3^+$  de levure est inséré dans l'ADN du plasmide 2 $\mu$  de levure entre les sites de restriction Hind III (2) et Hind III (3) avec perte du segment correspondant de l'ADN du plasmide 2 $\mu$  de levure.
4. Un plasmide hybride selon la revendication 1, caractérisé en ce que le segment d'ADN renfermant le gène  $URA_3^+$  de levure est inséré dans l'ADN du plasmide bactérien.
5. Un plasmide hybride selon l'une des revendications 2 et 3, caractérisé en ce que l'ADN du plasmide bactérien comporte une insertion d'un ADN d'un organisme eucaryote.
6. Un plasmide hybride selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'ADN du plasmide bactérien comporte l'insertion d'un ADN d'un organisme eucaryote en plus du segment ADN renfermant le gène  $URA_3^+$  de levure.
7. Un plasmide hybride selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'ADN de plasmide bactérien est l'ADN du plasmide pCR1 ou pBR 322.
8. Un plasmide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'ADN du plasmide 2  $\mu$  de levure est inséré dans l'ADN du plasmide bactérien entre des sites de restriction Eco RI.

9. Un microorganisme comportant un plasmide hybride selon l'une des revendications 1 à 8.

10. Une levure selon la revendication 9.



FIG\_4

FIG. 5





Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0011562

Numéro de la demande

EP 79 40 0853

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 7)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
P	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 91, no. 5 30 Juillet 1979, page 304, no. 35566v Columbus, Ohio, U.S.A. C. GERBAUD et al.: "High frequency of yeast transformation by plasmids carrying part or entire 2- $\mu$ m yeast plasmid" & GENE 1979, 5(3), 233-53 (Eng.) * Abrégé *	1-10	C 12 N 15/00// 9/88
P	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 90, no. 15, 9 avril 1979, page 319, no. 117850b Columbus, Ohio, U.S.A. M.L. BACH et al.: "Evidence for transcriptional regulation of orotidine-5'-phosphate decarboxylase in yeast by hybridization of mRNA to the yeast structural gene cloned in Escherichia coli" & PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 1979, 76(1), 386-90 (Eng.) * Abrégé *	1,7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 3)  C 12 N 15/00 9/88
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 86, no. 13, 28 mars 1977, page 242, no. 86012r Columbus, Ohio, U.S.A. C.P. HOLLENBERG et al.: "Synthesis of high molecular weight polypeptides in Escherichia coli minicells directed by cloned Saccharomyces cerevisiae 2- $\mu$ m DNA" & GENE 1976, 1(1), 33-47 (Eng.) * Abrégé *		CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES  X: particulièrement pertinent A: arrière-plan technologique O: divulgation non-écrite P: document intercalaire T: théorie ou principe à la base de l'invention E: demande faisant interférence D: document cité dans la demande L: document cité pour d'autres raisons
<input checked="" type="checkbox"/> Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			&: membre de la même famille, document correspondant
Lieu de la recherche La Haye		Date d'achèvement de la recherche 15-02-1980	Examineur DESCAMPS



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0011562

Numéro de la demande

EP 73 40 0853

-2-

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 3)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 87, no. 11, 12 septembre 1977, page 282, no. 81110g Columbus, Ohio, U.S.A. M. GUERINEAU et al.: "Structure and genetics of the 2<math>\mu</math>m circular DNA in yeast".</p> <p>&amp; GENET. BIOG. CHLOROPLASTS MITOCHONDRIA INTERDISCIP. CONF. 1976, 557-64 (Eng.)</p> <p>* Abrégé *</p>		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 3)